

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Vlastnosti myších buněk transformovaných fúzním genem *bcr-abl*

Properties of *bcr-abl* Transformed Mouse Cell Lines

Autoreferát dizertační práce

PhD Thesis Summary

Monika Fliegl

Praha 2014

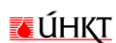
Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze



Autor: Mgr. Monika Fliegl

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách

Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

<i>Obsah</i>	2
<i>Abstrakt</i>	3
<i>Úvod</i>	4
<i>Hypotéza a cíle práce</i>	4
<i>Materiál a metodika</i>	6
<i>Výsledky</i>	7
<i>Diskuze</i>	9
<i>Závěry:</i>	13
<i>Abstract</i>	14
<i>Introduction</i>	15
<i>Hypothesis and aims</i>	15
<i>Materials and Methods</i>	17
<i>Results</i>	18
<i>Discussion</i>	20
<i>Conclusions</i>	24
<i>Použitá literatura / Reference list</i>	25
<i>Curriculum Vitae</i>	26

Abstrakt

V současné době patří chronická myeloidní leukémie (CML) mezi onkologická onemocnění, která jsou nejlépe prostudovaná na molekulární úrovni. Její vznik těsně souvisí s translokací mezi chromozomy 9 a 22, která vede ke vzniku fúzního genu *bcr-abl* kódujícího fúzní protein Bcr-Abl. Genová modifikace způsobuje nežádoucí zvýšení aktivity tyrosin-kinázy (TKA) kódované genem *abl*. Po zavedení léčby imatinib mesylátem a dalšími inhibitory tyrosin-kinázy (ITK), které se označují jako ITK druhé generace, se výrazně zlepšila kvalita života i délka přežití pacientů trpících CML. Současná cílená terapie však pouze zastavuje průběh nemoci a snad jen výjimečně ji vyléčí. Jedním z hlavních důvodů je, že se nádorové buňky nechovají při léčbě pasivně. Poměrně často dochází k mutacím, které mají za následek selekci klonu, který je na užitou farmakoterapii rezistentní; či k amplifikaci fúzního genu *bcr-abl*. Moderní farmakoterapie založená na ITK též není s to zasáhnout nádorové kmenové buňky, které se stávají při přerušení léčby zdrojem relapsu nemoci. Jedinou současnou možností vyléčení CML je transplantace allogenních hematopoetických kmenových buněk. Slabinami tohoto terapeutického přístupu jsou malý počet vhodných dárců a také vysoká morbidita a mortalita u nemocných příjemců.

V současné době je rozšířeno přesvědčení, že problémy s léčbou nemoci vyřeší imunoterapie, která by se mohla stát vhodným doplňkem „klasické“ léčby. Úspěšná imunoterapie by krom toho podstatně snížila náklady na jednoho léčeného pacienta, podle některých odhadů při nejmenším na 1/3 současné ceny.

Cílem snažení vědeckého kolektivu, jehož jsem členkou, je vývoj a prověrka terapeutických vakcín proti CML. Mým úkolem bylo řešit některé dílčí úkoly související s vývojem vakcín. K modelovému studiu imunologie a biologie buněk transformovaných lidským fúzním genem *bcr-abl* využíváme myších (BALB/c) buněčných linií B210 a 12B1. Ty byly transformovány fúzním genem pomocí retrovirových vektorů. Nedílnou součástí našeho úsilí je nalezení způsobů, jak posílit terapeutický účinek vakcinace dalšími intervencemi.

Předkládaná dizertační práce popisuje tři dílčí projekty, jejichž řešením jsem byla pověřena. První je zaměřen na proteomovou analýzu zmíněných buněčných linií s cílem vysvětlit jejich rozličné chování *in vitro* a *in vivo*. Druhá část práce se týká vývoje buněčné

vakcíny zaměřené proti neoangiogenezi u CML a jejího testování *in vitro* a *in vivo*. Třetím projektem byl pokus vyvolat pomocí DNA vakcíny imunitu proti chemokinu SDF-1 α , který hraje důležitou roli v patogenezi leukemií. Provedené studie přinesly řadu nečekaných pozorování, které jsem se pokusila vysvětlit.

Úvod

Chronická myeloidní leukémie patří mezi myeloproliferativní onemocnění, charakterizované klonální proliferací maligně transformované hematopoetické kmenové buňky. Typická je masivní proliferace buněk myeloidní řady s převahou postižení granulopoezy. Pro CML je charakteristická cytogenetická odchylka označovaná jako Filadelfský chromozóm (Ph+), který vzniká v důsledku reciproké translokace (9;22) (q34; q11). Výsledkem chromozomové aberace je vznik fúzního genu *bcr-abl* kódujícího fúzní protein Bcr-Abl (P210^{bcr-abl}), který hraje klíčovou roli v leukemogenezi. Se zvýšením povědomí o imunologických procesech, které provázejí průběh nemoci, se nabízí řešení léčby CML pomocí imunoterapie. CML je pro ni vhodným kandidátem z několika důvodů: (Vonka 2010). Jsou to (i) pomalý rozvoj nemoci, který dává dostatečný časový prostor pro imunoterapeutický přístup; (ii) nádorové buňky cirkulují v krvi a lymfatickém systému, což zajišťuje kontakty mezi nimi a imunitním systémem; (iii) nádorové buňky obsahují specifický antigen Bcr-Abl, který vyvolává syntézu dalších TAA (tumor asociovaných antigenů), které se v normálních buňkách dospělého jedince nevyskytují, jde např. o některé cancer-testis antigeny; (iv) kromě toho, a to je obzvláště příznivý moment, existuje velmi účinná chemoterapie, která redukuje nádorovou masu a tím i tvorbu nádorem produkováných imunosupresivních faktorů.

Hypotéza a cíle práce

Konečným cílem našeho snažení je vývoj vakcíny proti CML. Na myším (BALB/c) modelu využíváme k studiu imunitních reakcí linie B210 a 12B1 transformovaných lidským fúzním genem *bcr-abl*. Obě indukují leukemii po i.v. podání. Buňky 12B1 jsou přibližně 100krát onkogennější než B210 a kromě leukemie vyvolávají po subkutánním (s.c.) podání tvorbu solidních nádorů typu lymfomů. Obě linie se rovněž liší schopností vyvolat imunitu a vnímavostí k imunologickým reakcím organismu. Buňky B210 mají výjimečnou vlastnost

ochránit myši proti čelenži homologními buňkami; imunizační účinek má i s.c. podání malých množství živých buněk. Při čelenži buňkami 12B1 je účinnost imunity daleko nižší, ačkoli obě buněčné linie produkují stejná množství P210^{bcr-abl} proteinu. Dřívější studie pacientů s CML ukázaly, že protein P210^{bcr-abl} nenese imunodominantní epitopy, což naznačuje, že z imunologického hlediska jsou důležitější než samotný fúzní protein ty proteiny, jejichž tvorbu v leukemických buňkách vyvolává. Domníváme se, že rozdíly, které zjišťujeme mezi našimi liniemi, souvisejí se zmíněným pozorováním. Cílem mé studie je rozšíření znalostí o antigenní struktuře obou buněčných linií, což by mohlo přispět k identifikaci proteinů zodpovědných za vyšší imunogennost buněk B210 a za odlišný onkogenní potenciál buněk 12B1.

Nedílnou součástí úsilí o vývoj protinádorových terapeutických vakcín je také nalezení způsobů, jak posílit terapeutický účinek specifické vakcinace dalšími intervencemi. Předpokládá se, že jedním z nejúčinnějších bude zásah proti angiogenezi, bez níž není možný invazivní růst nádoru a tvorba metastáz. Mezi substance, které mají schopnost potlačit nádorovou angiogenezi a růst nádoru, patří endostatin (ES). Tento C-terminální produkt proteolytického štěpení kolagenu XVIII potlačuje proangiogenní signální dráhy a aktivuje dráhy protiangiogenní. Cílem mé práce bylo zjistit účinek produkce ES nádorovými buňkami na jejich onkogenní potenciál.

Mnohé studie potvrdily, že nádorové (stromální) mikroprostředí kostní dřeně ovlivňuje přežívání leukemických buněk. Výrazně tomu přispívá přítomnost receptoru CXCR4 na povrchu nádorových buněk jak lymfoidní tak myeloidní řady a produkce chemokinu SDF-1 α buňkami stromatu i endoteliálními buňkami ve stavu hypoxie. Vazba ligandu SDF-1 α na receptor CXCR4 indukuje chemotaxi leukemických buněk, která vede k jejich migraci do mikroskopických nik kostní dřeně. Komplex SDF-1 α /CXCR4 ovlivňuje dráhy PI3K/Akt a MAPK nádorových buněk, čímž zvyšuje jejich potenciál k přežívání a další proliferaci. Cílem našeho úsilí bylo vytvořit DNA vakcínu zaměřenou proti SDF-1 α . Očekávali jsme, že vyvoláním imunitních reakcí proti tomuto chemokinu bude posílena účinnost specifické protinádorové vakcíny.

Cíle práce:

Projekt 1: Identifikace TAA v buňkách myších linií B210 a 12B1, které byly transformovány fúzním genem *bcr-abl* a produkují protein Bcr-Abl.

Projekt 2: Příprava a vyzkoušení vakcíny z buněk geneticky modifikovaných tak, aby exprimovaly myší gen pro ES.

Projekt 3: Vyvolání imunity proti SDF-1 α , jednomu z chemokinů, které podporují růst nádorů.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů MZCR IGA NS 10634-3/2009 a MZ0UHKT 2005.

Materiál a metodika

Buněčné linie

Ve většině experimentů jsem použila myší buněčné linie B210 a 12B1. Tyto buňky jsou transformované fúzním genem *bcr-abl*. V některých experimentech mi posloužily jako kontroly buněčné linie HUVEC (human umbilical-vein endothelial cells, Cascade, Biologics, UK), TE-2, HeLa, K562, 293T a HL60.

Plazmidy

V experimentech byly použity plazmidy: pBLAST49-mEndo, pBSC/SDF-1 α , pTR-UF2.

Transdukce buněk

Buněčné linie byly genově modifikovány pomocí elektroporace nebo kalciumfosfátové precipitace.

Western blotting

Pro testování produkce proteinů buněčnými liniemi jsem použila Western blotu (WB). Po blokaci byla PVDF membrána inkubována s primární protilátkou v příslušném ředění po dobu 60 min. při standardní laboratorní teplotě a dále pak při 4 °C přes noc. Druhý den byla membrána inkubována se sekundární protilátkou IgG značenou HRP (horseradish peroxidase). Chemiluminiscentní reakce byla vizualizována kitem ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Health Biosciences, PA, USA) a použitím filmů Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Health Biosciences, PA, USA).

Kinexus protein array

Pro vyšetření přítomnosti 800 buněčných signálních proteinů v lyzátech buněk linií B210 a 12B1 bylo využito KinexTM Antibody Microarray Services (Kinexus, Vancouver, Kanada). Set testovaných proteinů zahrnoval 193 protein-kináz, 24 fosfatáz, 150 regulačních podjednotek těchto enzymů a dalších 433 signálních proteinů regulujících proliferaci, reakci na stres a apoptózu. Příslušný servis zahrnoval ještě potvrzení přítomnosti 18 proteinů vybraných na základě výsledků protilátkové matice (array) metodou multi-blottingu.

ELISA

Pro stanovení proteinů v plazmě myši jsem využila komerční soupravy testů ELISA. Při provádění bylo postupováno dle pokynů výrobce.

Experimenty na zvířatech

Ve všech pokusech byly použity laboratorní myši-samice kmene BALB/c ve věku 6-8 týdnů (Charles Rivers), se standardní dietou a ustájením v konvenčních chovech (Centrum pro experimentální biomodely, 1. LF UK). Všechny pokusy prováděné na zvířatech byly v souladu s legislativou platnou v ČR.

Gene Gun

Metoda gene gun je založena na biobalistické střele částic DNA navázaných na zlato. Pod tlakem helia 400 psi, je vstřelena dávka obsahující 1μg DNA do podkoží pokusných zvířat v břišní oblasti. Při přípravě nábojů jsem postupovala podle pokynů výrobce.

Výsledky

Projekt 1: Identifikace TAA v buňkách myších linií B210 a 12B1, které byly transformovány fúzním genem *bcr-abl* a produkují protein Bcr-Abl

Na základě našeho zadání byla firmou Kinexus zjišťována v lyzátech buněk obou linií přítomnost 800 signálních proteinů. Významný rozdíl v přítomnosti proteinů v lyzátech buněk B210 a 12B1 byl pomocí protilátkové matice detekován v 31 případech. Nejvýznamnějšími rozdíly v síle reaktivity se týkaly integrinu β1 v případě buněk 12B1 a kaspáz (jmenovitě CASP6 a CASP7) v případě buněk B210. Lyzáty buněk 12B1 zvýšeně reagovaly rovněž

s protilátkami proti proteinům Vrk1, STK33, PKM2, IRAK3, Tlk1, MARK, Btk, FAK, IKKa, ZAP70, JNK2/3. V případě lyzátů buněk B210 se zvýšení reaktivity týkalo proteinů CASP2, CAMK2 β , p38 α MAPK, p38 γ MAPK, CAMK2 γ , Hsp27, CAMKK, mTOR, CASP5, Hsp90, Hsp90 β , Histone H2A.X, CAMK4, Hsp90 α , Erk2, Erb2 (Her2) v linii B210. Podle výsledků získaných pomocí protilátkových matic bylo vybráno několik proteinů pro vyšetření pomocí WB. Počet těchto vyšetření byl omezen smluvními podmínkami s firmou Kinexus. Pouze u části proteinů, a to integrinu β 1 a CaMK4 v buňkách 12B1 a kaspáz, MAPKp38, Erk2, Histone H2A.X a Hsp90 v buňkách B210 byla prokázána jejich zvýšená produkce.

Produkci dalších vybraných proteinů jsem testovala metodou WB. Proteiny ADRP, ARK-1, Bcl-x_L a RHAMM byly silně produkovány jak buňkami B210 tak i buňkami 12B1, a to přibližně v stejném množství. Proteiny CML66, Hsp70 a PD1 byly detekovány v nízkých hladinách bez významných rozdílů mezi buňkami B210 a 12B1. V dalších pokusech jsem zjišťovala proteiny CAIX, Nm23-H2 a SPAG9. Produkce CAIX byla vyšší v buňkách 12B1 než v buňkách B210. Naopak, produkce proteinů Nm23-H2 a SPAG9 byla vyšší v buňkách B210. Produkce proteinu SPAG9 byla rovněž vyšší v buňkách B210 než v buňkách 12B1. Překvapivě pod hranicí detekce metodou WB byly proteiny TERT, Pr-3, Wt-1, cathepsin G, survivin a PRAME-like 1, které jsou zjišťovány v lidských leukemických buňkách.

Projekt 2: Příprava a vyzkoušení vakcíny z buněk geneticky modifikovaných tak, aby exprimovaly myší gen pro ES

Pro přípravu experimentální vakcíny jsem použila buňky B210, které byly transfekované metodou elektroporace bicistronickým plazmidem nesoucím geny pro myší ES a pro rezistenci k blasticidinu. Od transdukované linie jsem odvodila 10 klonů, které produkovaly ES. V proliferačním testu s buňkami HUVEC jsem potvrdila biologickou aktivitu proteinu. Populace klonů byla velmi heterogenní, pokud šlo o produkci ES. Pro další experimenty jsem vybrala dva klony, výrazně se lišící v tvorbě ES. Obě sublinie byly použity k experimentům na zvířatech. Při ověřování onkogenního potenciálu jsem získala velmi překvapivé výsledky. Leukemogenní potenciál transdukovaných buněk byl sice snížen, ale téměř u poloviny experimentálních zvířat inokulovaných dávkou 10⁶ buněk jsem zaznamenala tvorbu solidních nádorů. Nádory byly bohatě vaskularizované bez známek nekrózy. V tumorech byla potvrzena přítomnost *bcr-abl*-pozitivních buněk. Buňky linií odvozených od nádorů produkovaly ES.

Projekt 3: Pokus o vyvolání imunity proti SDF-1 α , jednomu z chemokinů, které podporují růst nádorů

Tento projekt byl pokračováním práce kolegy Lučanského, která ozřejmila, že se inokulací příslušného plazmidu nepodařilo vyvolat imunitní reakce proti SDF-1 α . U inokulovaných zvířat však došlo ke změně onkogenního potenciálu buněk 12B1 použitých k čelení. Pokusila jsem se objasnit, proč podání plazmidu obsahujícího gen pro SDF-1 α , rezultovalo v potlačení výskytu solidních nádorů a zvýšení leukemogeneze.

Testovala jsem přítomnost dalších proteinů v lyzátech buněk 12B1. Potvrdila jsem silnou produkci receptoru pro SDF-1 α , který se označuje jako CXCR4, a transkripčního faktoru HIF-1 α , který je silným induktorem CXCR4. Tento protein jsem zjistila jak v cytoplazmě, tak v izolovaných buněčných jádrech. Produkci SDF-1 α jsem v lyzátech buněk nezjistila ani ve WB ani v testu ELISA. Naproti tomu zvířata s nádory měla vysoké hladiny cirkulujícího chemokinu prokazovaného testem ELISA.

Diskuze

Projekt 1: Identifikace TAA v buňkách myších linií B210 a 12B1, které byly transformovány fúzním genem *bcr-abl* a produkují protein Bcr-Abl

Cílem studie byla částečná proteomová analýza dvou myších buněčných linií B210 a 12B1, které byly v předchozích letech na našem oddělení hojně využívány k experimentům *in vivo* i *in vitro* (Sobotkova et al. 2005; Lucansky et al. 2009; Petrackova et al. 2010). Obě linie patří do lymfoidní řady, ale liší se vývojovým stupněm. Podle exprese povrchových markerů jsou buňky 12B1 klasifikovány jako *pre-B*, zatímco buňky B210 jako *pro-B* buňky. Cílem mého projektu bylo rozšířit znalosti o produkci TAA těmito dvěma liniemi a na základě zjištěných rozdílů se pokusit vysvětlit jejich odlišné chování *in vivo*.

Studium proběhlo ve dvou fázích. V první jsem využila nabídky firmy Kinexus vyšetřit pomocí protilátkových mikroarrayů lyzáty buněk obou linií na přítomnosti 800 proteinů, které hrají roli při buněčném růstu. Ve druhé fázi jsem se pokusila v buněčných lyzátech prokázat přítomnost myších analogů proteinů, o kterých je známo, že jsou produkovány v buňkách pacientů s CML.

Pro vyšetření signálních proteinů byl využit komerční servis *Kinexus Antibody Microarray Analysis (KAMA)* s následující detekcí vybraných proteinů pomocí WB. S

pomocí KAMA byly mezi liniemi 12B1 a B210 detekovány statisticky významné rozdíly v produkci 31 proteinů. V případě buněk 12B1 byla zjištěna zvýšená produkce 12 proteinů. Spolehlivější WB ji však prokázal pouze u 2, a to integrinu $\beta 1$ a CAMK4. V případě buněk B210 byla zjištěna zvýšená produkce u 19 proteinů, což potvrdilo vyšetření WB pouze u 7 proteinů, a to PKM2, MAPK (izoformy p38 γ a p38 α), Hsp90, Erk2, CASP5 a CASP7. Rozpor mezi výsledky obou testů by mohl souviset s jejich rozdílnou citlivostí, se skutečností, že v mikroarrayích se detekují proteiny v nativní formě, a konečně s mnohem vyšším rizikem falešně pozitivních výsledků v tomto testu. Prvním proteinem byl integrin $\beta 1$ (jehož zvýšená produkce byla prokázána jak v protilátkových mikroarrayích tak ve WB), který zprostředkuje vazbu na fibronectin. Jeho možný vztah k rozdílným vlastnostem zkoumaných buněk je prozatím nejasný. Analýza je komplikována přítomností proteinu Bcr-Abl, o němž je známo, že ovlivňuje adhezivitu buněk na fibronectin (Barnes et al. 2005). Smysluplnější je zvýšení produkce CAMK4. Jde o multifunkční protein-kinázu, jež je považována za součást dráhy vedoucí k aktivaci antiapoptických signálních drah. Skutečnost, že není exprimována v buňkách B, ale produkují ji *pre-B* buňky 12B1, činí možnou její účast ve vysokém onkogenním potenciálu těchto buněk. Jak již bylo zmíněno, několik proteinů je účinněji tvořeno buňkami B210. Protein Hsp90 byl popsán jako protein vážící se na P210^{bcr-abl} (Nimmanapalli et al. 2001), jeho přítomnost v Bcr-Abl-pozitivních buňkách se dala očekávat. Rozdíl mezi zkoumanými liniemi byl malý a lze si jen těžko představit, že by mohl významně ovlivnit rozdílný onkogenní potenciál zkoumaných buněk. Další proteiny, které byly ve větší míře produkovány buňkami B210, patří do rodiny MAPKs. Produkce proteinu p38 α MAPK byla v buňkách 12B1 snížena přibližně o 65 % ve srovnání s buňkami B210 a p38 γ MAPK byl dokonce detekován pouze v buňkách B210. V minulosti bylo prokázáno, že tyto proteiny indukují senescenci (Kwong et al. 2009), která vede k snížení buněčné proliferace a k apoptóze. Domnívám se proto, že nižší onkogenní potenciál buněk B210 souvisí s jejich produkcí. V buňkách B210 byla zjištěna i zvýšená produkce kaspáz CASP6 a CASP7, které rovněž mohou přispět k snížení onkogenního potenciálu. Zjištěné malé rozdíly v produkci dalších proteinů lze jen obtížně interpretovat.

Při měření produkce myších analogů TAA jsem nenacházela mezi zkoumanými buněčnými liniemi žádné významné rozdíly s výjimkou proteinů CAIX, Nm23-H2 a SPAG9. Soudí se, že všechny tři jsou indukovány fúzním proteinem Bcr-Abl. Protein CAIX byl ve zvýšené míře vytvářen v buňkách 12B1. Je to membránový protein, který patří do rodiny karboanhydráz (Zavadova and Zavada 2005). Katalyticky aktivní enzym je spojen s hypoxií,

kteřá doprovází růst nádorů (Stubbs et al. 2000). Tyto poznatky ve svém souhrnu činí možným, že vyšší onkogennost buněk 12B1 a tvorba solidních tumorů po s.c. inokulaci souvisí také s produkcí CAIX. Pokud je mi známo, detekce proteinu CAIX v našich buňkách je první zprávou o jeho přítomnosti v myších buňkách rodiny B. Zvýšená produkce proteinů Nm23-H2 a SPAG9 by mohla být aspoň částečně odpovědnou za snížený onkogenní potenciál a zvýšenou imunogennost buněk B210 (Smahel 2011; Suri et al. 2012).

Překvapivě nebyly ani u jedné buněčné linie detekovány proteiny TERT, cathepsin G, Pr-3, PRAME-like 1, survivin a Wt-1, o kterých je známo, že je produkují nádorové buňky CML.

Projekt 2: Příprava a vyzkoušení vakcíny z buněk geneticky modifikovaných tak, aby exprimovaly myší gen pro endostatin

Pro přípravu buněčné vakcíny proti angiogenezi jsem použila buněčnou linii B210. Pro transfekci mi posloužil bicistronický plazmid nesoucí gen pro myší ES a gen pro blasticidinovou rezistenci. Z transdukované linie B210/E jsem izolovala celkem 10 buněčných klonů. Pro další experimenty jsem vybrala dva, které se výrazně lišily v produkci ES. Chtěla jsem zjistit, zda množství vytvářeného ES, ovlivní chování buněk *in vivo*.

Při srovnání s mateřskou linií B210, byly buňky produkující ES méně onkogenní. V případě inokulace mateřskými buňkami B210 v dávce 10^6 buněk, zvířata umírala na leukemii kolem 20. dne po inokulaci. Myši, pokud nezahynuly do 30. dne po inokulaci, začaly tvořit mnohočetné rychle rostoucí intrathorakální, intraabdominální a subkutánní solidní nádory. Buňky nádoru produkovaly ES, stejně tak jako linie od nich odvozené, takže změnu onkogenního potenciálu nezpůsobila ztráta nebo umlčení transgenu. Překvapivě byly nádory velmi dobře vaskularizované bez známek nekrózy. V minulosti byla popsána řada *proangiogenních* faktorů, které produkují buňky pacientů s CML (Sillaber et al. 2004). Takové buňky pak mohou mít výhodu ve formě rezistence vůči intervencím proti angiogenezi. Je možné, že bohatá vaskularizovaná síť v našem experimentálním modelu vznikla z nediferenciovaných nádorových buněk, které se účinkem produktů prostředí nádoru transdiferencovaly na buňky, jež vykazují endoteliální markery. Tento jev je popsán jako vaskulogenní mimikry (Maniotis et al. 1999; Hillen and Griffioen 2007). Je možné, že výrazně ovlivnil naše výsledky (van der Schaft et al. 2004).

Projekt 3: Pokus o vyvolání imunity proti SDF-1 α , jednomu z chemokinů, které podporují růst nádorů

Původním cílem projektu bylo navodit imunitní odpověď proti SDF-1 α a tím posílit účinnost specifické vakcíny zaměřené proti buňkám transformovaným fúzním genem *bcr-abl*. Pro čelenž bylo použito buněk 12B1, protože tvoří po subkutánní inokulaci solidní nádory, jejichž velikost lze použít jako spolehlivý ukazatel síly imunitních reakcí. Nepodařilo se nám prokázat, že by opakované nitrokožní podání plazmidu, který nesl gen pro SDF-1 α , rezultovalo ve vzniku buněčné či humorální imunity k tomuto proteinu. Z výsledků pokusů, s nimiž začal Dr. Lučanský, vyplynulo zajímavé zjištění: „vakcína“ pBSC/SDF-1 α výrazně ovlivnila onkogenní potenciál buněk 12B1. U zvířat, kterým byl podán plazmid pBSC/SDF-1 α samostatně, ale i v kombinaci s plazmidem pBSC/BCR-ABL, byl zvýšený počet zvířat, která umírala na leukemii a netvořila solidní nádory jako zvířata kontrolní. To byl efekt právě opačný tomu, který jsem zaznamenala v právě popsaném systému buněk B210 geneticky modifikovaných tak, aby tvořily ES. Tato pozorování vypovídají o labilitě onkogenního potenciálu obou buněčných linií.

Získané výsledky pravděpodobně souvisejí s vlastnostmi použitých buněk. Buňky 12B1, které jsou charakterizovány jako *pre-B* buňky, produkují protein Bcr-Abl a také proteiny CXCR4, který je receptorem pro SDF-1 α , a HIF-1 α , který jako transkripční faktor zvyšuje produkci CXCR4 (Cronin et al. 2010) a významně podporuje přežívání leukemických buněk v myším modelu CML (Zhang et al. 2012). Úloha chemokinů SDF-1 α v patogenezi leukemie je spojována s osou SDF-1 α /CXCR4 (Kittang et al. 2010). Interakce ligandu SDF-1 α s receptorem CXCR4 vede ke zvýšené adhezi leukemických buněk k stromálním buňkám kostní dřeně, ale i k buňkám tzv. extramedulárních nik, a k jejich zvýšené proliferaci a diferenciaci.

Na základě zmíněných pozorování je možné změněné chování 12B1 buněk vysvětlit tak, že SDF-1 α vyvolal zrychlenou migraci buněk 12B1 do extramedulárních nik. Zvýšenou migrací buněk z místa inokulace mohlo dojít k výraznému lokálnímu snížení počtu nádorových buněk, takže jich nezbývalo dost pro vyvolání solidního nádoru. Ve hře ale mohlo být i snížení adhezivity buněk 12B1 k nádorovému stromatu, které mohlo způsobit, že buňky 12B1 tvořily solidní nádory s nižší účinností.

Za vysoké hladiny proteinu SDF-1 α v plazmě zvířat, která měla nádory, pravděpodobně odpovídaly buňky nádorového stromatu.

Nicméně kromě samotného SDF-1 α se mohly na procesu změny onkogenního potenciálu podílet i další faktory. Je nutné si uvědomit, že chemokiny nejsou v systému *in vivo* izolované, ale že ovlivňují celou řadu signálních kaskád a interagují s dalšími proteiny. Navíc je potřeba brát v úvahu přítomnost fúzního proteinu Bcr-Abl, který ovlivňuje řadu drah včetně osy SDF-1 α /CXCR4. Kromě toho byla popsána řada chemických substancí jako např. PGE2, kyselina hyaluronová, fibrinogen a další, které ovlivňují reaktivitu buněk s SDF-1 α (Ratajczak et al. 2013).

Závěry:

Projekt 1: Proteomová analýza prohloubila znalosti o antigenní struktuře *bcr-abl* pozitivních myších buněčných linií B210 a 12B1. Byly detekovány rozdíly v produkci několika signálních proteinů i TAA. Buňkami 12B1 se produkovalo více integrinu β 1, CAMK4 a CAIX. V buňkách B210 se tvořilo více MAPK (dvou izoform), kaspáz CASP6 a CASP7, Nm23-H2 a SPAG9. Výsledky umožňují alespoň z části pochopit rozdíly v biologickém chování zkoumaných buněčných linií a skýtají vodítka pro další výzkumnou práci.

Projekt 2: Z buněk B210 se podařilo izolovat a prověřit dvě buněčné sublinie s rozdílnou produkcí biologicky aktivního proteinu ES. Onkogenní potenciál buněk produkujících ES byl snížen, avšak pokud zvířata nezemřela kolem 20. dne po inokulaci na leukemii, začaly se u nich po 30. dnu tvořit bohatě vaskularizované intraabdominální, intrathorakální a subkutánní nádory. Změna onkogenního potenciálu a růst nádorů *in vivo* nebyly provázeny ztrátou produkce ES.

Projekt 3: Intrakutánní aplikace plazmidu nesoucí gen pro SDF1- α nevyvolala imunitní reakci proti tomuto chemokinu, ale způsobila změnu onkogenního potenciálu buněk 12B1 užitých k čelenži. Při jejich další analýze byla potvrzena produkce transkripčního faktoru HIF-1 α a jím indukovaného proteinu CXCR4, který je receptorem pro SDF-1 α . CXCR 4 byl rovněž zjištěn v izolovaných buněčných jádrech. Ani ve WB ani pomocí testu ELISA nebyl chemokin zjištěn v buňkách 12B1. V plazmě zvířat, která měla solidní nádory, byly nalezeny vysoké hladiny SDF1- α , nejspíš produkovaného stromatem nádoru. Na základě uvedených pozorování byla vyslovena hypotéza, že změna onkogenního potenciálu buněk souvisí s interakcí mezi chemokinem a proteinem CXCR4.

Abstract

At present, chronic myeloid leukemia (CML) is one of the best understood oncological disorders at the molecular level. Its development is closely related to the translocation between chromosomes 9 and 22 that leads to the formation of the *bcr-abl* fusion gene encoding Bcr-Abl fusion protein. This gene modification results in an undesirable increase of the activity of the tyrosine kinase (TKA) encoded by the *abl* gene. After the introduction of imatinib mesylate and other tyrosine kinase inhibitors (TKI), referred to as the second generation TKI, the quality of life and the survival of patients with CML has greatly improved. Current drug treatment stops the progression of the disease and induces a remission; however, it only rarely, if ever, results in a cure. One of the main reasons is that cancer cells do not behave passively during the treatment. Frequently, the mutations of the gene lead to the selection of a clone, that is pharmacotherapy-resistant; or to an amplification of the *bcr-abl* fusion gene. Furthermore, modern drug therapy based on TKIs does not eradicate tumor stem cells, which are the source of the leukemia relapse. Currently, the only possibility of curing CML is transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. The weaknesses of this therapeutic approach include scarcity of suitable donors and a relatively high morbidity and mortality in the patient recipients.

At present, it is a widespread conviction among the oncologists that immunotherapy may help to solve the problems associated with the treatment of the disease, and that it could soon develop into an efficient complement of the "classical" treatments. Successful immunotherapy would also significantly reduce the cost of treatment, according to some estimates, to at least 1/3 of the current price.

The aim of the efforts of our scientific team, of which I am a member, is the development and testing of therapeutic vaccines against CML. My task was to solve some issues related to the development of the vaccine. In our experiments we are using murine (BALB/c) B210 and 12B1 cell lines transformed by the human *bcr-abl* fusion gene by means of the retroviral vectors. An integral part of our efforts is to find ways how to enhance the therapeutic effect of vaccination with other interventions.

This thesis describes the outcome of three sub-projects for which I was responsible. The first one was directed to proteomic analysis of the cell lines mentioned and aimed at explaining their different behavior *in vitro* and *in vivo*. The second concerned the

development of cell vaccines directed against neoangiogenesis in CML and their testing *in vitro* and *in vivo*. The third one was an attempt to induce immunity against the SDF-1 α by a DNA vaccine. This chemokine plays an important role in the pathogenesis of leukemia. The studies produced a series of unexpected observations, which I tried to explain.

Introduction

Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disease, characterized by clonal proliferation of malignantly transformed hematopoietic stem cells. The massive proliferation of cells of the myeloid lineage is typical for this disorder. CML is characterized by cytogenetic aberration known as the Philadelphia chromosome (Ph+), which arises as a result of a reciprocal translocation (9; 22) (q34; q11). The outcome of this chromosomal aberration is the formation of the *bcr-abl* fusion gene encoding Bcr-Abl (P210^{bcr -abl}) fusion protein which plays a key role in leukemogenesis. Increasing understanding of the immunological processes that accompany the development and progression of the disease has gradually created conditions for employing immunotherapy in its treatment. For several reasons CML seems to be a good candidate for immunotherapy (Vonka 2010). These include: (i) the slow development of the disease, which provides sufficient time for an immunotherapeutic approach, (ii) tumor cells circulate in the blood and lymphatic system, which ensures efficient contacts between the tumor cells and the immune system, (iii) tumor cells carry specific Bcr-Abl antigen, this protein induces the synthesis of other TAAs (tumor associated antigens) that do not occur in normal adult cells, e.g. some cancer - testis antigens, and (iv) a highly effective targeted therapy is available that reduces tumor burden, which implies that it also reduces the production of immunosuppressive factors induced by the tumor.

Hypothesis and aims

The aim of our efforts is the development of a therapeutic vaccine against CML. In our experiments we are using murine (BALB/c) cell lines B210 and 12B1 which were transformed with the human *bcr-abl* fusion gene using retroviral vectors. Both induce leukemia after i.v. administration, but 12B1 cells are approximately 100 times more oncogenic than B210 and, in addition to leukemia, they also induce solid lymphoma-type tumors after subcutaneous (s.c.) administration. Both lines also differ in the ability to elicit immunity. B210 cells have the unique ability to protect mice against the challenge with homologous cells; immunization effect is induced by s.c. administration of small amounts of living cells. After challenge with 12B1 cells the immunity is much lower, although both cells

produce approximately the same amount of P210^{bcr-abl} protein. Earlier studies in CML patients showed that the P210^{bcr-abl} protein does not carry immunodominant epitopes, suggesting that other proteins induced by the fusion protein in the leukemic cells are more important for eliciting immunity. The aim of my study was to broaden the present knowledge of the antigenic make-up of the two cell lines, which could contribute to the identification of proteins responsible for a higher immunogenicity of B210 cells and for their different oncogenic potential.

Attempts to enhance the therapeutic effect of vaccination with other interventions are an integral part of our efforts. It is assumed that one of the most effective approaches will be the suppression of angiogenesis, which is needed for invasive tumor growth and metastasis formation. Endostatin (ES), the C-terminal proteolytic cleavage product of collagen XVIII, is one of the substances with the potential to inhibit tumor angiogenesis and tumor growth. The aim of my work was to determine the effect of ES production by tumor cells on their oncogenic potential.

Many studies have presented an evidence that tumor (stromal) bone marrow microenvironment influences the survival of leukemic cells. The presence of the CXCR4 receptor on the surface of tumor cells of lymphoid and myeloid lineage and the production of the chemokine SDF-1 α by stromal cells and endothelial cells in a state of hypoxia significantly contribute to this. The binding of the SDF-1 α ligand to CXCR4 receptor induces chemotaxis of leukemic cells, enabling their migration into microscopic bone marrow niches. SDF-1 α /CXCR4 axis affects the PI3K/Akt and MAPK pathways in tumor cells, thereby increasing their potential for survival and proliferation. The aim of our efforts was to create a DNA vaccine directed against SDF-1 α . We hoped that eliciting an immune response against this chemokine would enhance the effectiveness of specific anticancer vaccines.

Project 1: Identification of TAA in the murine B210 and 12B1 cells

Project 2: The preparation and testing of an experimental vaccine from cells genetically modified to express ES

Project 3: Attempts to induce immunity against SDF-1 α

This work was supported by grant projects IGA NS MZCR 10634-3/2009 and MZ0UHKT 2005

Materials and Methods

Cell lines

In most experiments, murine cell lines B210 and 12B1 were used. These cells were transformed with the *bcr-abl* fusion gene. In some experiments, HUVEC (human umbilical-vein endothelial cells, Cascade Biologics, UK), TE-2, HeLa, K562, HL60 and 293T cells were used as controls.

Plasmids

The following plasmids were used: pBLAST49-mEndo, pBSC/SDF-1 α and pTR-UF2.

Cell transduction

Cell lines have been genetically modified using electroporation and calcium-phosphate precipitation.

Western Blotting

The presences of proteins were monitored either in cell lysates or in concentrated tissue culture media. After blocking, the PVDF membrane was incubated with the appropriate primary antibody for 60 min. at room temperature and then at 4 ° C overnight. The next day the membrane was incubated with secondary IgG antibody labeled with HRP (horseradish peroxidase). The reactions were visualized using the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Health Biosciences, PA, USA).

Kinexus protein arrays

KinexTM Antibody Microarray Services (Kinexus, CA) was used for monitoring the expression of 800 cell signaling proteins in lysates of B210 and 12B1 cells. The system

targets 193 protein kinases, 24 protein phosphatases and 150 regulatory subunits of these enzymes and other 433 signaling proteins that regulate cell proliferation, reaction to stress and apoptosis. Attempts were made to verify a portion of the microarray results by WB multi-blotting.

ELISA

To detect proteins in plasma of the experimental animals, commercial ELISA kits were used following the manufacturer's instructions.

Animal experiment

In all experiments, female laboratory mice BALB/c aged 6-8 weeks (Charles Rivers) with a standard diet, kept in conventional barns (Center for Experimental Biomodels, 1st Medical Faculty of Charles University) were used. All experiments were carried out in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation valid in the Czech Republic.

Gene Gun

Gene gun method is based on biobalistic shot of DNA particles bound to gold. Under the pressure of helium (400 psi) shots containing 1µg DNA were administered into the skin of the abdominal area of the experimental animals.

Results

Project 1: Identification of TAAs in the murine B210 and 12B1 cells

By means of the Antibody Microarray System (Kinexus) significant differences between the 12B1 and B210 in the expression of signalling proteins were detected in the total of 31 instances. Most marked differences were the increased expression of integrin $\beta 1$ in 12B1 cells and caspase proteins (CASP6, CASP7) in B210 cells. Lysates of 12B1 cells exhibited increased reactivity with Vrk1, STK33, PKM2, IRAK3, Tlk1, MARK, Btk, FAK, IKK, ZAP70, JNK2/3 antibodies. In the case of B210 cell lysates increased reactivity with CASP2, CAMK2 β , p38 α MAPK, p38 γ MAPK CAMK2 γ , Hsp27, CAMKK, mTOR, CASP5, Hsp90 Hsp90 β , Histone H2A.X, CAMK4, Hsp90 α , Erk2, Erb2 (Her2) antibodies was observed. The presence of a portion of the respective proteins was monitored by WB.

Increased production of integrin $\beta 1$ and CAMK4 was detected in 12B1 cells, and caspases, MAPKp38, Erk2 Histone H2A.X, Hsp90 in B210 cells.

In additional WB experiments performed in our laboratory I detected strong expressions of ADRP (adipophilin), ARK-1 and Bcl-x_L proteins in both B210 and 12B1 cells, while CML66, Hsp70 and PD1 were produced at a much lower rate without marked differences among the two cells. Further experiments indicated that CAIX was expressed more effectively in 12B1 than in B210 cells. On the other hand, the production of Nm23-H2 and SPAG9 was higher in B210 cells. TERT, Pr-3, Wt-1, cathepsin G, survivin and PRAME-like 1 were not detected in cell lysates of either cells.

Project 2: Preparation and testing of an experimental vaccine from cells genetically modified to express ES

B210 cell line was used. After transfection with the bicistronic plasmid carrying the genes for mouse ES and for resistance to blasticidine, cells were cultivated in the presence of blasticidine. From the population of the transduced cells I isolated 10 cell clones. For subsequent tests I selected two of these clones, one with the highest and one with the lowest production of ES. To demonstrate that the ES produced by the transduced cells was biologically active, its inhibitory activity on the proliferation of HUVEC cells was demonstrated. To determine the oncogenic potential of the ES-producing cells, mice were inoculated intravenously with the parental and the ES-producing cells. The results were quite surprising. Leukemogenic potential of transduced cells was indeed reduced, but almost half of the experimental animals inoculated with 10⁶ cells developed solid tumors. Tumors were well vascularized without signs of necrosis. From several tumors, cell lines were isolated which produced ES demonstrable in cell lysates by WB.

Project 3: Attempts to induce immunity against SDF-1 α

This project was a continuation of the work started in our laboratory by V. Lučanský. The original purpose of his experiments was to induce an immune response against SDF-1 α . The inoculation of the appropriate plasmid failed to induce an immune response against SDF-1 α . However, in the inoculated animals the oncogenic potential of 12B1 cells used for challenge was changed. I tried to explain why the administration of a plasmid containing the gene for SDF-1 α resulted in the suppression of solid tumors and increased leukemogenesis.

The lysates of 12B1 cells and the lysates obtained from the subcutaneous tumors and from cultures derived from them contained substantial amounts of CXCR4. I demonstrated the presence of CXCR4 in both the cytosolic and nuclear fractions of 12B1 cells. HIF-1 α was also detected in the lysates of 12B1 cells. I tested both the culture media and the cell lysates of 12B1 in ELISA and by WB, respectively, for the presence of SDF-1 α . SDF-1 α was not detected in either of these preparations using two different antibody systems. In contrast, the high level of the circulated chemokine was detected in samples of plasma of the solid tumor bearing animals.

Discussion

Project 1: Identification of TAAs in the murine B210 and 12B1 cells

The aim of my present study was to examine the protein expression in two mice *bcr-abl*-transformed B210 and 12B1 cell lines used in our previous experiments in our laboratory (Sobotkova et al. 2005; Lucansky et al. 2009; Petrackova et al. 2010). I wanted to broaden the present knowledge on the TAAs expression pattern and cell signaling protein presence in the *bcr-abl*-transformed cells, with the hope that the results obtained will contribute to our understanding of the different behaviour of B210 and 12B1 cells *in vivo*. The study consisted of two phases. In the first one, I made use of the offer of the Kinexus company to test the lysates of B210 and 12B1 cells for the presence of 800 proteins involved in the cell growth cycle. In the second one, I tried to detect the murine analogues of proteins known to be produced by human CML cells, in the lysates of these two cells.

To determine the contents of signaling proteins in the lysates of the 12B1 and B210 cells Antibody Microarray Analysis kit was employed. Significant differences were revealed in the case of 31 proteins. However, when using the more reliable WB, increased expression in 12B1 cells was demonstrated only in the case of two proteins, namely integrin β 1 and CAMK4, and in B210 cells in the case of 7 proteins, namely PKM2, MAPK (isoforms p38 α and p38 γ), Hsp90, Erk2, CASP5 and CASP7. The differences between the results of the two tests may be associated with either the higher sensitivity of the antibody microarray, or with the fact that this test monitors native proteins or with the possibility that it frequently provides falsely positive data. In 12B1 cells an increased production of integrin β 1 was revealed in both the microarray test and WB. This integrin mediates the interaction with fibronectin.

Its role in the properties of the cell lines tested is not well understood at this writing. The analysis is complicated by the previous observation that Bcr-Abl protein influences the adhesivity of cells to fibronectin (Barnes et al. 2005). It is also possible that other molecules expressed on the surface of the cells due to their different differentiation state, might be involved. The increased production of CAMK4 protein in 12B1 makes more sense. The enzyme is a multifunctional protein-kinase which is considered to be a part of the pathway leading to the activation of signaling antiapoptotic pathways. The fact that it is more efficiently produced by 12B1 cells makes it likely that it plays some role in their high oncogenic potential.

As already mentioned, some other proteins are more effectively produced by B210 cells than by 12B1 cells. Protein Hsp90 has been observed to be a P210^{bcr-abl} binding protein (Nimmanapalli et al. 2001). The amounts of the protein are only moderately higher in B210 cells than in 12B1 cells and one can hardly imagine that they played any role in the oncogenicity of the cells examined. Other proteins found to be increased in B210 cells belong to the MAPK family. The expression of p38 α MAPK was increased by about 65% in B210 cells and p38 γ MAPK was only detected in these cells but not in 12B1 cells. It has been shown that these proteins induce senescence (Kwong et al. 2009), reduce cell proliferation and contribute to apoptosis. Therefore, I assume that their expression may be associated with the lower oncogenic potential of B210 cells. Also CASP 7 and CASP 6 proteins were markedly more produced by B210 cells than by 12B1 cells. Because of their role in cell biology, it seems likely that they are - at least partially- responsible for the lower oncogenic potential of the B210 cells and, possibly, they also contribute to their increased immunogenicity. The small difference in the productions of other proteins is difficult to interpret.

Both cell lines were examined for the presence of several TAAs which had been demonstrated in CML cells. There were no significant differences between the expression of the proteins tested, except of Nm23-H2, CAIX and SPAG9. It is assumed that the production of all of them is associated with the Bcr-Abl protein activity. CAIX, a membrane protein that is a member of the carboanhydrase family (Zavadova and Zavada 2005) was overexpressed in lysates of 12B1 cells. This catalytically active enzyme is associated with hypoxia accompanying cancer growth. Growth factors, genome instability, cell-cell adhesion and tumour metastasis occur in the presence of acidic microenvironment (Stubbs et al. 2000). The present finding may suggest that the increased production of CAIX is involved in the

increased oncogenic potential of 12B1 cells and in their capability of inducing solid tumors. As far as I am aware the detection of CAIX in our cells is the first demonstration of its presence in the mouse B cell family. The increased production of Nm23-H2 and SPAG9 might be involved in both the decreased oncogenicity and immunogenicity of the B210 cells (Suri et al. 2012; Smahel 2011).

Surprisingly, TERT, cathepsin G, Pr-3, PRAME-like1, survivin and Wt-1, known to be produced by human CML cells, were not detected in either cell line.

Project 2: The preparation and testing of a vaccine from cells genetically modified to express ES

In the present series of experiments I used B210 cells, which are capable of inducing leukemia after intravenous inoculation into syngeneic animals. The transduced cells expressing ES were isolated in medium supplemented with blasticidine. For further experiments two clones were selected, one with high and one with a relatively low production of ES, to monitor the possible influence of the quantity of the ES produced on the behavior of the transduced cells *in vivo*. The results obtained when we tested the oncogenic potential of the ES-producing cells were quite surprising. When compared with the parental cells, the transduced cells were partially attenuated. While all mice inoculated with 10^6 parental B210 cells succumbed to leukemia before day 20 after inoculation, some animals inoculated with the same dose of the transduced cells survived this critical period. However, after day 30 they started to develop multiple rapidly growing intrathoracic, intraabdominal and subcutaneous solid tumors. Their cells produced ES *in situ* and cell lines derived from them also produced ES, this proving beyond reasonable doubt that the capability of the transduced cells to induce solid tumors was not due to the loss or silencing of the transgene. In spite of the production of ES, the tumors were well vascularized without any detectable signs of necrosis. It should be recalled that increased expression of pro-angiogenic factors in *bcr-abl* positive cells has been reported (Sillaber et al. 2004), thus these cells might be well equipped to resist the effects of ES or similar substances. It is also possible that the vasculature network in the present system was composed of dedifferentiated tumor cells which transdifferentiated into cells expressing endothelial cell markers. This phenomenon known as vasculogenic mimicry (Maniotis et al.

1999; Hillen and Griffioen 2007) has been reported to be resistant to ES (van der Schaft et al. 2004).

Project 3: Attempts to induce immunity against SDF-1 α

The original purpose of this study was to induce an immune response against SDF-1 α . However, with the methods used neither humoral nor cell-mediated immune responses against SDF-1 were detected. Yet, some interesting effects of administering the pBSC/SDF-1 α plasmid were apparent. These concerned the oncogenic potential of *bcr-abl*-transformed 12B1 cells.

Administering the SDF-1 α expressing plasmid simultaneously with specific vaccination against these cells resulted in a somewhat increased survival among vaccinated mice, but the difference was not statistically significant. However, when only the development of solid tumors was taken into consideration, the situation was different; their occurrence was significantly decreased. In parallel, SDF-1 α plasmid administration resulted in a significant enhancement of the leukemogenic potential of 12B1 cells.

I can only speculate about the mechanisms that might be involved. The results obtained in this study were definitely associated with the nature of the cells used. 12B1 cells are of pre-B origin they express the Bcr-Abl protein and produce substantial amounts of CXCR4 and HIF-1 α . This transcription factor is known to upregulate CXCR4 expression (Cronin et al. 2010) and has been shown to be required for the survival of leukemic stem cells in a mouse CML model (Zhang et al. 2012). The role of the SDF-1 α chemokine in patients with leukemia has been most frequently discussed in association with the SDF-1 α /CXCR4 axis (Kittang et al. 2010). It has been assumed that SDF-1 α interactions with CXCR4 are crucial for leukemic stem cell adhesion to stromal cells, which would enable their self-renewal, proliferation, and differentiation arrest.

I assume that the SDF-1 α that was formed accelerated the migration of the 12B1 cells to extramedullar niches where the proliferation of leukemic cells occurred. The rapid migration of these cells from the site of inoculation, if this really occurred, reduced the number of cells that were capable of inducing subcutaneous tumors, thereby leading to a delay in their appearance or even to reducing the number of the remaining cells below the

tumor-inducing dose. These events might also be associated with the decreased adhesion of tumor cells to stromal cells, which would reduce the capability of the 12B1 cells to induce solid tumors.

In addition, other factors might have been involved. SDF-1 α has multiple other functions, some of which might act in concert with the phenomena observed. Chemokines are not isolated entities, but act in complex networks with other signaling systems. Moreover, it is impossible to neglect the Bcr-Abl protein in the cells used in the present experiments. As already noted, this protein is known to influence the functionality of the SDF-1 α /CXCR4 axis. It has also been shown that a number of other factors, such as prostaglandin E, hyaluronic acid, fibrinogen, cleavage of the C3 component of complement, and others, prime or enhance the responsiveness of cells to SDF-1 α (Ratajczak et al. 2013).

Conclusions

Project 1: Proteomic analysis broadened the knowledge of the antigenic make-ups of the *bcr-abl*-positive murine cell lines B210 and 12B1. Differences were detected in the production of several signaling proteins and TAAs. The obtained results allow us -at least in part- to understand the differences in the biological behavior of the cells tested and provide leads for further research.

Project 2: Two cell sublines with varying production of biologically active ES were isolated from the parental B210 cells. Oncogenic potential of producing ES cells was reduced and animals which did not die of leukemia within three weeks after inoculation developed well vascularized intraabdominal, intrathoracic, and subcutaneous tumors later on. The changed oncogenic potential was not accompanied with the loss of ES production.

Project 3: Administration of a plasmid carrying SDF-1 α gene did not induce immune reactions against this chemokine but resulted in a change of oncogenic potential of the 12B1 cells used for the challenge. In the subsequent analysis the production of the transcription factor HIF-1 α and the CXCR4 protein, which is a receptor for SDF-1 α , was revealed in the 12B1 cells. The chemokine was not detected in 12B1 cells either by WB or in ELISA. In the plasma of tumor-bearing animals high levels of SDF-1 α were demonstrated. Based on these observations, it is hypothesized that the change of oncogenic potential was associated with the interaction between the chemokine and CXCR4 expressed on the surface of the 12B1 cells.

Použitá literatura / Reference List

- Barnes DJ, Schultheis B, Adedeji S and Melo JV. (2005). *Oncogene*, **24**, 6432-6440.
- Cronin P, Wang J and Redmond HP. (2010). *BMC Cancer*, **10**, 225.
- Hillen F and Griffioen A. (2007). *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 489-502.
- Kittang A, Hatfield K, Sand K, Reikvam H and Bruserud O. (2010). *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology*. Bruserud O. (ed). Springer Berlin Heidelberg: pp. 149-172.
- Kwong J, Hong LX, Liao R, Deng QD, Han JH and Sun PQ. (2009). *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 11237-11246.
- Lucansky V, Sobotkova E, Tachezy R, Duskova M and Vonka V. (2009). *International Journal of Oncology*, **35**, 941-951.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJC. (1999). *American Journal of Pathology*, **155**, 739-752.
- Nimmanapalli R, O'Bryan E and Bhalla K. (2001). *Cancer Research*, **61**, 1799-1804.
- Petrackova M, Sobotkova E, Duskova M, Stanek L and Vonka V. (2010). *International Journal of Molecular Medicine*, **26**, S20.
- Ratajczak MZ, Serwin K and Schneider G. (2013). *Theranostics*, **3**, 3-10.
- Sillaber C, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Krauth MT and Valent P. (2004). *European Journal of Clinical Investigation*, **34**, 2-11.
- Smahel M. (2011). *Cancer Immunol Immunother*, **60**, 1655-1668.
- Sobotkova E, Ludvikova V, Petrackova A, Duskova M, Smetana K, Jelinek F, Marinov I and Vonka V. (2005). *Folia Biologica*, **51**, 12-18.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR and Bashford CL. (2000). *Mol Med Today*, **6**, 15-19.
- Suri A, Saini S, Sinha A, Agarwal S, Verma A, Parashar D, Singh S, Gupta N and Jagadish N. (2012). *OncoImmunology*, **1**, 1194-1196.
- van der Schaft DWJ, Seftor REB, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, Yokoyama Y, Griffioen AW and Hendrix MJC. (2004). *Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 1473-1477.
- Vonka V. (2010). *Immunotherapy*, **2**, 227-241.
- Zavadova Z and Zavada J. (2005). *Oncology Reports*, **13**, 977-982.
- Zhang H, Li H, Xi HS and Li S. (2012). *Blood*, **119**, 2595-2607.

Curriculum Vitae

Monika Fliegl (rozená Krmencíková)

Vzdělání:

- 2009- dosud Ph.D. student Biomedicíny v programu: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha
- 2009 IPVZ - Odborný akreditovaný kvalifikační kurz – Odborné laboratorní metody, získání zdravotnické způsobilosti
- 2009 Osvědčení o odborné způsobilosti k řízení, provádění a kontrole pokusů na zvířatech podle §17, CZ 00174
- 2002-2007 Mgr., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha
- Diplomová práce na téma: *Kadmium a jeho potenciální vliv na organismus*, vypracováno na Státním zdravotním ústavu, Praha, školitel: RNDr. Maxim Vojtíšek, CSc.

Zaměstnání:

- 2008 - dosud Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha - vědecký pracovník
- 2007-2008 Klinika nemocí z povolání 1. LF UK a VFN, Praha- vědecký pracovník a pracovník Toxikologického informačního centra

Ocenění:

- 2011 1. místo v soutěži o nejlepší prezentaci doktorské práce na ÚHKT za rok 2010 s příspěvkem "*Vlastnosti myších buněk transformovaných fúzním genem bcr-abl produkujících endostatin*"

1. Publikace, které jsou podkladem dizertace:

Krmencikova M, Stanek L., Petrackova M., Dundr P., Vonka V.: Unexpected properties of endostatin-producing mouse BCR-ABL-transformed cells. Int J Oncology 40: 487-493, 2012, **IF: 2,657**

Lucansky V. *, **Krmencikova-Fliegl M.** *, Stanek L., Vonka V.: Administering a plasmid that expresses stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) influences mouse bcr-abl-transformed cells oncogenic potential. Molecular Medicine Reports – **přijato do tisku**, IF: **1,17**

* Both should be considered as first authors.

2. Publikace bez vztahu k tématu dizertace

Vonka V., Humlova Z., Klamova H., Kujovská-Krcmova L., Petrackova M., Hamsikova E., **Krmencikova – Fliegl M.**, Duskova M. and Zdenek Roth: Kynurenine levels in chronic myeloid leukemia patients. Biomed Research International – **zasláno do tisku**

Konferenční příspěvky:

Krmenciková M. et al.: Signaling Protein Profiles and Antigenic Make-ups of Two Mouse BCR-ABL-Transformed Cell Lines, CRI Annual Symposium, New York, USA, 2012

Krmenciková M. et al.: Pilot Study of Protein Expression in Two Mouse BCR-ABL Positive Cell Lines. Czech-Slovak Forum of Young Scientists, Mikulov, 2011

Krmenciková M. et al.: Protein Profiling of Two Mouse BCR-ABL-Transformed Cell Lines. Blood 118, (ASH Annual Meeting Abstracts), 2011

Krmenciková M. et al.: Some Properties of Endostatin Expressing BCR-ABL Transformed Mouse Cells. I. konferenci České společnosti pro genovou a buněčnou terapii ČLS JEP "Novinky v buněčné terapii, genové terapii a imunoterapii: od základního výzkumu ke klinickým aplikacím", Mikulov, 2010

Krmenčíková M. et al.: Altered Properties of BCR-ABL-Transformed Mouse Cells Expressing, 18th ESGCT Annual Congress, Milano, 2010

Pelclová D., Fenclová Z., **Krmenčíková M.**, Navrátil T., Kuzma M., Kačer P.: Are the levels of markers of oxidative stress in EBC influenced by their blood levels? European Respiratory Society Annual Congress, Berlín, 2008

Krmenčíková M., Pelclová D., Fenclová Z., Navrátil T., Kuzma M., Kačer P.: EBC markers in pneumoconioses at different ventilation rates. European Respiratory Society Annual Congress, Berlín, 2008

Vojtíšek M., **Krmenčíková M.**, Knotková J., Kašparová L., Švandová E., Holuša R., Putta J., Tejnorová Z., Chotašová K.: Cadmium and blood-brain barrier. *12th Interdisciplinary Czecho-Slovak Toxicological Conference*, Praha, 2007